

ESPECIFICIDAD DE TEJIDO EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DURANTE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE ARABIDOPSIS

RAQUEL IGLESIAS-FERNÁNDEZ, BELÉN ROMBOLÁ-CALDENTY,
PALOMA RUEDA-ROMERO, CRISTINA BARRERO-SICILIA, PILAR CARBONERO
Y LUIS OÑATE-SÁNCHEZ*.

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Campus de Montegancedo, Pozuelo de Alarcón, 28223, Madrid, Spain. *(luis.onate@upm.es)

Resumen

El control de la germinación de las semillas repercute enormemente en la supervivencia y dispersión de las plantas además de ser un importante carácter agronómico. Los diferentes tejidos de la semilla intervienen en la regulación de la germinación de forma diferencial. La identificación de grupos de genes reguladores y sus dianas en su contexto espacio-temporal permitirá comprender mejor como interaccionan entre ellos y con el ambiente para coordinar el potencial germinativo de las semillas. Utilizando genes marcadores de este proceso con diferentes patrones de expresión y mediante aproximaciones filogenómicas, hemos identificado secuencias en sus promotores con un papel relevante en el control de su transcripción. Mediante el uso de estas secuencias en cribados de un híbrido en levaduras con una genoteca de 1.200 factores de transcripción (TFs), hemos identificado reguladores de los genes estudiados con un papel relevante en la planta. Nuestros resultados indican que existe una compleja regulación transcripcional específica de tejido en el control de la germinación y que la aproximación utilizada es extremadamente eficiente y permite filtrar la redundancia génica existente en las familias de TFs.

Introducción

La semilla es un órgano de vital importancia para la dispersión y supervivencia de las plantas, proporciona alimento a humanos y animales y tiene un gran potencial biotecnológico. La transición desde un estado durmiente a uno germinativo es una etapa clave en el ciclo de vida de las plantas y constituye un rasgo de enorme importancia ecológica y comercial, además de un excelente modelo para estudiar la integración de señales ambientales en plantas. En *Arabidopsis*, la capacidad de la semilla para germinar depende del balance entre la restricción física impuesta por las cubiertas seminales (testa y endospermo) y la habilidad del embrión para crecer y atravesarlas (1). Durante, pero mayoritariamente tras la germinación, las sustancias de reserva son degradadas por enzimas hidrolíticas para proporcionar energía y precursores biosintéticos a la planta en crecimiento hasta que adquiere capacidad fotosintética. La mayoría de los componentes genéticos implicados en estos procesos han sido estudiados principalmente mediante el análisis de mutantes con germinación alterada, que han puesto de manifiesto el papel primordial y antagónico de las hormonas ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GA) en el control de este proceso. Las GA, a diferencia del ABA, favorecen la germinación estimulando el debilitamiento de las cubiertas seminales y el crecimiento del embrión (1). La contribución diferencial de los tejidos de la semilla a la germinación parece indicar que existen diferencias en sus rutas de señalización hormonal (2). Por ejemplo, genes implicados en la biosíntesis de GA durante la germinación tienen diferentes patrones específicos de expresión que pueden alterarse en respuesta a varios estímulos. Además, algunos genes que responden a GA no se expresan de forma uniforme en todos los tejidos de la semilla (3, 4). Todas estas evidencias sugieren que el control de la germinación puede estar mediada por grupos de TFs asociados a sus genes diana con funciones específicas en el proceso y coordinados espacio-temporalmente.

Materiales y métodos

La obtención de promotores ortólogos y su análisis mediante herramientas bioinformáticas, así como la generación y cribado de la genoteca de TFs de *Arabidopsis* se describen en (5), la obtención de RNA de semillas, síntesis de cDNA, PCR cuantitativa y ensayos de germinación están descritos en (6, 7) y las hibridaciones *in situ* de RNAs se hicieron según lo descrito en (8).

Resultados y discusión

Hemos estudiado la regulación de tres genes que representan diferentes categorías funcionales necesarias para la germinación de las semillas. Un gen que codifica

una lipasa tipo GDSL (*LIP1*) posiblemente implicada en la movilización de reservas lipídicas durante la germinación y en la post-germinación (5, 9). Un gen que codifica una endo- β (1 \rightarrow 4)-mananasa (*MAN7*) con un probable papel en la remodelación de las paredes celulares y en el debilitamiento de los tejidos que rodean al embrión durante la germinación (10). Un gen que codifica una catepsina (*CathB3*) asociada a la hidrólisis de proteínas durante la germinación y en la posterior movilización de reservas (11). Los mRNAs derivados de dichos genes se acumulan con diferentes cinéticas y en diferentes tejidos durante la imbibición de las semillas. Los mRNAs de *LIP1* se detectan exclusivamente en las células de la epidermis del eje embrionario, los de *MAN7* en las células del endospermo micropilar y los de *CathB3* en la epidermis y tejido vascular del embrión y, en etapas post-germinativas, también en los cotiledones. Además, las pérdidas de función de dichos genes producen alteraciones sobre las cinéticas de germinación.

Para estudiar la regulación de los 3 genes mencionados se utilizó una aproximación filogenómica (*phylogenomic shadowing*). Se obtuvieron promotores de genes ortólogos a los tres estudiados en varias especies de la familia *Brassicaceae*, bien mediante la consulta de bases de datos para especies con genomas secuenciados o bien mediante su amplificación por PCR mediante el uso de oligonucleótidos degenerados. Las secuencias no codificantes de promotores de genes ortólogos divergen rápidamente durante la evolución, excepto aquellas que son importantes para la funcionalidad del gen. Mediante la comparación y análisis *in silico* de estas secuencias promotoras se identificaron bloques de secuencias conservadas en todas las especies comparadas. El tamaño e identidad de las regiones con mayor grado de conservación fue de 50bp (83%) para *LIP1*, 84bp (69%) para *CathB3* y 48bp (50%) para *MAN7*.

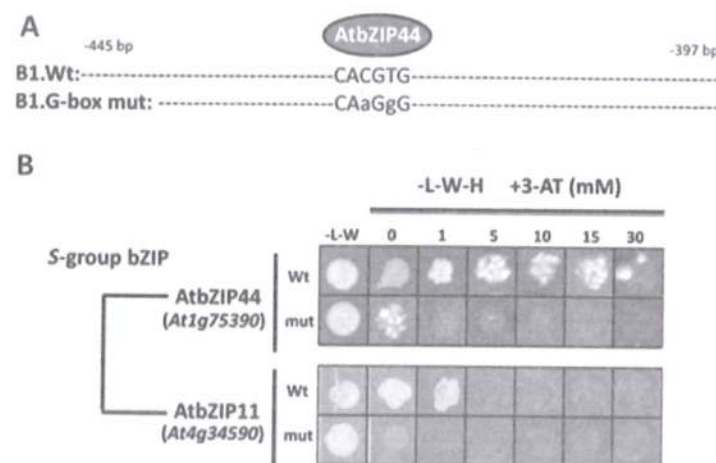


Figura 1. Cribado de 1-híbrido en levaduras. **A**, Secuencia de una caja G en el promotor de *AtMAN7* conservada en los promotores de genes ortólogos. También se indica una mutación de 2 pb en dicha caja. **B**, bZIP44 se une específicamente a la caja G. Cepas de levadura que contenían la secuencia conservada -445-397 con la caja G mutada (mut) o sin mutar (Wt), fueron conjugadas con cepas transformadas con las construcciones AD-bZIP44 o AD-bZIP11 (parálogo de bZIP44). Las células diploides se crecieron en un medio auxotrófico con concentraciones crecientes de 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT).

Mediante expresión transitoria o/y estable se comprobó que las secuencias identificadas tienen una relevancia funcional en la expresión de los genes estudiados, indicando que en la planta son reconocidos probablemente por TFs que regulan su transcripción. Se utilizaron dichas secuencias para cribar una genoteca con 1.200 TFs de *Arabidopsis* mediante el sistema de un híbrido en la levadura *S.cerevisiae*. Se identificaron 3 TFs diferentes capaces de unirse a cada una de las secuencias utilizadas y mediante mutagénesis se delimitaron los elementos en *cis* responsables de dicha unión. Para las secuencias de los promotores de los genes *LIP1*, *MAN7* y *CathB3*, se identificaron los TFs ATML1, bZIP44 y GBF1, respectivamente. ATML1 pertenece a la clase IV de la familia homeodominio-cremallera de leucinas (HD-ZIP) con 5 miembros presentes en la genoteca. bZIP44 y GBF1 pertenecen a las subfamilias S y G, respectivamente, de la familia bZIP de TFs. La subfamilias S y G tienen 17 y 4 miembros presentes en la genoteca, respectivamente. Aunque las secuencias en *cis* reconocidas por los TFs identificados se habían descrito como secuencias consenso para los miembros de sus familias, sólo pudimos detectar la unión de un miembro específico de cada familia en nuestro sistema (Figura 1). Esto indica que las secuencias identificadas mediante este procedimiento, además de

que pueden contener una combinación de elementos en *cis*, proporcionan valiosa información sobre secuencias flanqueantes que pueden determinar la especificidad de unión y filtrar la redundancia observada mediante procedimientos *in vitro*.

Para determinar si las interacciones observadas eran relevantes en la plantas se analizó mediante hibridaciones *in situ* si los TFs y sus correspondientes genes diana se expresaban en los mismos tejidos celulares al mismo tiempo. Se observó que los TFs identificados tienen los mismos patrones específicos de tejido que sus genes diana durante la imbibición de semillas (Figura 2A-2F). Además, se analizaron fenotípica y genotípicamente plantas con ganancia y/o pérdida de función de los TFs identificados. Se observó que tanto ATML1 como bZIP44 son reguladores positivos de la expresión de sus genes diana (Figura 2G) y de la germinación. Por el contrario, GBF1 ejerce un papel negativo sobre la expresión de *CathB3* y sobre la germinación (5, 8, 11).

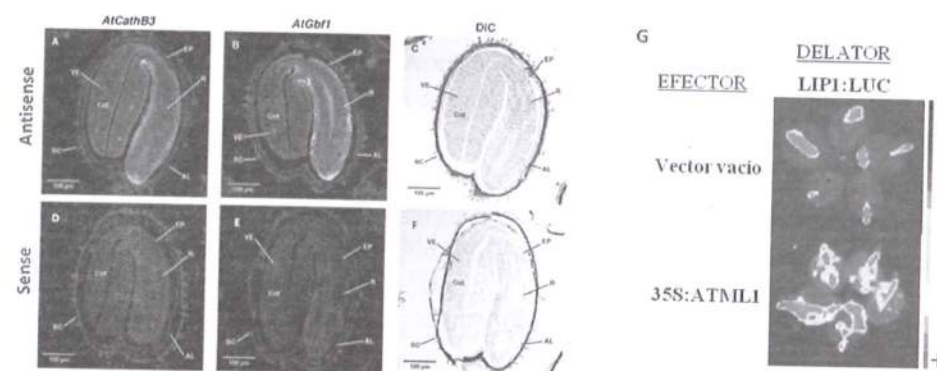


Figura 2. Hibridación *in situ* de mRNAs en semillas embebidas durante 30h: *CathB3* (A), *Gbf1* (B). Se muestran los controles negativos al hibridar con las sondas sentido en (D y E). Todas las imágenes son producto de la fusión de aquellas obtenidas con el anticuerpo anti-ratón IgG conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor 488 y la tinción DAPI para revelar el núcleo. Paneles C y F: Imágenes de Contraste por Interferencia Diferencial (DIC). AL: aleurona; Cot: cotiledones; SC: cubierta seminal; R: radícula; EP: epidermis; VE: elementos vasculares. G, La secuencia conservada en el promotor del gen *LIP1* es una diana de ATML1. Se bombardearon hojas de plantas transgénicas que contenían una fusión de dicha secuencia con el gen de la luciferasa (LUC), empleando como efectores las construcciones indicadas sobre cada panel. Los paneles muestran la bioluminiscencia (actividad LUC) observada.

Como conclusión, nuestros resultados avalan la utilización de las aproximaciones utilizadas para aumentar el conocimiento sobre la compleja regulación subyacente a la germinación de las semillas. Gracias a estas aproximaciones, hemos caracterizado 3 módulos reguladores de la expresión génica cuya alteración produce efectos

notables sobre la germinación. La extensión de esta regulación sobre otros genes diana, su regulación por factores ambientales, y la posible existencia de regulación cruzada entre ellos será objeto de estudios posteriores.

Bibliografía

- Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJ (2008) Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol* 179: 33-54.
- Penfield S, Li Y, Gilday AD, Graham S, Graham IA (2006) Arabidopsis ABA INSENSITIVE4 regulates lipid mobilization in the embryo and reveals repression of seed germination by the endosperm. *Plant Cell* 18: 1887-1899.
- Yamaguchi S, Kamiya Y, Sun T (2001) Distinct cell-specific expression patterns of early and late gibberellin biosynthetic genes during Arabidopsis seed germination. *Plant J* 28: 443-453
- Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S (2003) Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. *Plant Cell* 15: 1591-1604
- Castrillo G, Turck F, Leveugle M, Lecharny A, Carbonero P, Coupland G, Paz-Ares J, Oñate-Sánchez L (2011) Speeding *cis-trans* regulation discovery by phylogenomic analyses coupled with screenings of an arrayed library of Arabidopsis transcription factors. *PLoS ONE* 6(6): e21524
- Oñate-Sánchez L, Vicente-Carbajosa J (2008) DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Res Notes* 1: 93
- Rueda-Romero P, Barrero-Sicilia C, Gómez-Cadenas A, Carbonero P, Oñate-Sánchez L (2012) Arabidopsis thaliana DOF6 negatively affects germination in non-after-ripened seeds and interacts with TCP14. *J Exp Bot* 63: 1937-1949
- Iglesias-Fernández R, Barrero-Sicilia C, Carrillo-Barral N, Oñate-Sánchez L, Carbonero P (2013) *Arabidopsis thaliana* bZIP44: a transcription factor affecting seed germination and expression of the mannanase encoding gene *AtMAN7*. *Plant J* 74: 767-780
- Pritchard SL, Charlton WL, Baker A, Graham IA (2002) Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in Arabidopsis *Plant J* 31: 639-647
- Iglesias-Fernández R, Rodríguez-Gacio MC, Barrero-Sicilia C, Carbonero P, Matilla A (2011) Three endo- β -mannanase genes expressed in the micropylar endosperm and in the radicle influence germination of Arabidopsis thaliana seeds. *Planta* 233: 25-36
- Iglesias-Fernández R, Wozny D, Iriondo-de Hond, M, Oñate-Sánchez L, Carbonero P, Barrero-Sicilia C (2014) The *AtCathB3* gene expressed during germination and subsequent reserve mobilization in *Arabidopsis thaliana* is transcriptionally repressed by the bZIP protein GBF1. *J Exp Bot* (en prensa; d.o.i.10.1093/jxb/eru055)

¿ESTRIGOLACTONAS Y JASMONATOS: POSIBLE CROSS-TALK?

TORRES-VERA, R.; LÓPEZ-VALVERDE, F. J.; GARCÍA, J.M.; POZO, M. J.;
LÓPEZ-RÁEZ, J.A.

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación
Experimental del Zaidín-CSIC, Granada-España.

Resumen

Las SLs son una nueva clase de hormona que, además de regular la arquitectura de la planta, poseen un papel importante como señal en la simbiosis micorrícica arbuscular. Mutantes de tomate *spr2*, deficientes en JA presentan una reducción de los niveles de micorrización, al igual que los mutantes deficientes en SLs L16 y L09. Por ello, con el fin de estudiar una posible interacción entre las fitohormonas SLs y JA, se ha caracterizado fenotípicamente el mutante *spr2* y comparado con L16 y L09 con y sin micorrizar. El *spr2* mostró un fenotipo similar a L16, que presenta una reducción moderada en los niveles de SLs, indicando una posible reducción parcial de la producción de SLs, en este mutante.

Introducción

Las estrigolactonas (SL) son un grupo de fitohormonas derivadas de los carotenoides. Como hormona, una de sus funciones mejor conocidas, es su capacidad de inhibir la ramificación de la parte aérea. En consecuencia, los mutantes deficientes en SLs presentan una depresión en su crecimiento y una mayor ramificación (Cheng *et al.*, 2013). Un estudio reciente, ha revelado que esta reducción del crecimiento es debida a la capacidad de las SLs de modular la elongación internodal, más que al aumento del número de ramificaciones (de Saint Germain *et al.*, 2013).

Aparte de su función hormonal, las SLs fueron anteriormente descritas como molécula señal en la rizosfera, induciendo la ramificación de las hifas de